

Günther Gerhard Gerent

**UTILIZAÇÃO DE DOIS MARCADORES  
INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE PARA  
ESTUDOS DE CASO-CONTROLE**

Trabalho de Conclusão de  
Curso apresentado ao  
Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal de  
Santa Catarina, como  
requisito parcial para a  
obtenção do grau de  
Bacharel.

Orientador: Dr Andrea  
Rita Marrero.

Coorientadora: Dr Ilíada  
Rainha de Souza.

Florianópolis  
2013

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

A ficha catalográfica é confeccionada pela Biblioteca  
Central.

Tamanho: 7cm x 12 cm

Fonte: Times New Roman 9,5

Maiores informações em:

<http://www.bu.ufsc.br/design/Catalogacao.html>

Günther Gerhard Gerent

---

Prof.<sup>a</sup>. Maria Risoleta Freire Marques  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Andrea Rita Marrero, Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Iliada Rainha de Souza, Co-orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Msc Guilherme Debortoli  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Msc Sandra Regina Rachadel Torres  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

- ✓ À Dr<sup>a</sup> Andrea Rita Marrero, pela orientação acadêmica e profissional, confiança, e pelos ensinamentos dos quais recordarei sempre com carinho;
- ✓ À Dr<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza, pela confiança e pelos ensinamentos de Biologia e de vida;
- ✓ À Dr<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz pela orientação, embora indireta, mas igualmente importante;
- ✓ Ao Msc Guilherme Debortoli, pelos seus ensinamentos e ajuda;
- ✓ Aos integrantes, passados e presentes, do Laboratório de Polimorfismos Genéticos da Universidade Federal de Santa Catarina (LAPOGE/UFSC), pela troca de conhecimento e de experiências científicas;
- ✓ A todos que participaram das coletas de material biológico e extração de DNA utilizado nestas análises;
- ✓ Aos membros da banca (Dr.<sup>a</sup> Sandra Regina Rachadel Torres, Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz, Msc Guilherme Debortoli) que se dispuseram a avaliar e contribuir com sugestões para este trabalho;
- ✓ Aos voluntários que constituem esta amostra populacional, pois sem a sua gentil contribuição, esta pesquisa não se realizaria;
- ✓ Aos órgãos de fomento CAPES/ financiadora do projeto de pesquisa do CNPQ;
- ✓ À UFSC/CCB/BEG.

✓ AO HEMOSC



### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

- ✓ Aos meus pais, por todos os ensinamentos, pelo incentivo, apoio e amor. Sem vocês esse trabalho com certeza não existiria;
- ✓ Aos meus amigos de Florianópolis pelo apoio moral, pelas risadas nos fins de semana. Um agradecimento em especial para Vinícius, Jean, Lucas, André e Ahrymann, por tudo;
- ✓ A todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado, **MUITO OBRIGADO!**



“A ciência serve para nos dar uma  
ideia de quão extensa é a nossa  
ignorância.”

Félicité Robert de Lamennais

## RESUMO

Um dos desafios nos estudos genéticos é usar a pequena quantidade de diferenciação genética entre populações para inferir a história das migrações humanas. As diferenças genéticas entre as populações humanas derivam principalmente de gradações nas taxas de frequências alélicas a partir de genótipos distintos. A estrutura populacional foi identificada a partir da acumulação de diferenças de pequenas frequências alélicas através de muitos *loci*. Neste trabalho foram genotipados dois marcadores (APO e PV92) em uma amostra de 200 catarinenses (AR – Artrite Reumatoide e PSC – População de Santa Catarina), sem relação de parentesco entre si, doadores voluntários. Um desvio o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,050$ ), no grupo amostral AR (PV92 –  $p = 0,000$ ), foi realizado o Qui-Quadrado de homogeneidade, tanto para o marcador APO como para o PV92, a hipótese nula foi rejeitada, ou seja, os dois grupos amostrais não são homogêneos quanto às classes fenotípicas. Para APO o  $X^2$  calculado (26,6025) foi bem maior do que o  $X^2$  tabelado (5,99), e para PV92 o  $X^2$  calculado (32,2801) foi bem maior do que o  $X^2$  tabelado (5,99). Associações entre *loci* não ligados sugere miscigenação recente, sendo considerada tão mais recente quanto maior for o desequilíbrio de ligação por mistura. Não foram observadas associações entre os *loci* para a população de casos e para a de controle. A partir de testes exatos, foram encontradas diferenças alélicas e genotípicas entre as duas populações estudadas, ou seja, o valor de  $p < 0,05$  tanto para a diferenciação alélica (APO – 0; PV92 – 0,00072) como para a populacional (APO – 0; PV – 0,00618). Portanto, rejeita-se a hipótese de que os alelos e genótipos possuem a mesma distribuição em casos e controles, ou seja, são diferentes.

**Palavras-chave:** APO, PV92, AR, PSC, Equilíbrio de Hardy-Weinberg.



## ABSTRACT

One of the challenges in genetic studies is to use small amount of genetic differentiation among populations to infer the history of human migrations. Genetic differences among human populations derive mainly from gradients in allele frequencies from different genotypes. The population structure was identified from the accumulation of small differences in allele frequencies across many loci. In this work were genotyped two markers (APO e PV92) in a sample of 200 in Santa Catarina (AR-Rheumatoid Arthritis and PSC – Population of Santa Catarina), no relation to each other, volunteer donors. A deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $p < 0.050$ ), AR Group (PV92- $p = 0.000$ ), was held the Chi-square of homogeneity for both the APO and the PV92 marker, the null hypothesis was rejected, i.e. the two sample groups are not homogeneous with regard to phenotypic classes. For APO the  $\chi^2$  calculated (26.6025) was much larger than the  $\chi^2$  tabled (5.99), and for the  $\chi^2$  PV92 calculated (32.2801) was much larger than the  $\chi^2$  tabled (5.99). An association between loci not linked suggests recent miscegenation, being considered as latest the greater imbalance of connection by blending. Associations were not observed between the loci for population of cases and for the control. From exact tests, allele and genotype differences were found between the two populations studied, i.e., the value of  $p < 0.05$  for both the allelic differentiation (APO-0; PV92 – 0.00072) as for the population differentiation (APO-0; PV-0.00618). Therefore, rejects the hypothesis that the alleles and genotypes have the same distribution in cases and controls, i.e. they are different.

**Keywords:** APO, PV92, AR, PSC, Equilíbrio de Hardy-Weinberg.



## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Gráfico com as frequências do alelo 1 para os dois marcadores genéticos nos dois grupos mostrais.....	19
Figura 2 - Gráfico com as frequências do alelo 1 para os dois marcadores genéticos nos dois grupos amostrais comparados com a literatura.....	20
Figura 3 – Gel de agarose corado com GelRed para visualização de fragmentos de Inserção Alu.....	54



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição Étnica da População de Santa Catarina – IBGE/2008.....	4
Tabela 2 – Comprimentos dos fragmentos, localização citogenética e sequencia dos <i>primers</i> dos dois AIMs analisados.....	13
Tabela 3 - Frequências alélicas e genotípicas APO.....	16
Tabela 4 - Frequências alélicas e genotípicas PV92.....	17
Tabela 5 - Valores de $p$ para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores em equilíbrio para $p > 0,05$ .....	17
Tabela 6 – Tabela com frequência absoluta e esperada do marcador APO.....	17
Tabela 7 – Tabela com frequência absoluta e esperada do marcador PV92.....	18
Tabela 8 – Valor de $p$ para Diferenciação alélica e genotípica entre as populações de casos (AR) e controles (PSC).....	19
Tabela 9 - Condições de PCR dos dois AIMs analisados....	52





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIMs – *Ancestry Informative Markers*

ALD - *Admixture Linkage Disequilibrium*

APO – Marcador Genético

AR – Artrite Reumatoide

CGF - *Continous Gene Flow*

cM – Centimorgan

HI - *Hybrid Isolament*

INDEL – *Insertion/Deletion*

LD - *linkage disequilibrium*

MALD - *Mapping Admixture Linkage Disequilibrium*

PSC – População de Santa Catarina

PV92 – Marcador Genético

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

SNP - *Single Nuclotide Polymorphism*

TCLEs – Termo de Consentimento Livre Esclarecido



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	POPULAÇÃO BRASILEIRA COMO MODELO TRI-HÍBRIDO.....	2
1.2	ESTRUTURA POPULACIONAL .....	4
1.3	MARCADORES MOLECULARES.....	5
1.3.1	Marcadores Informativos de Ancestralidade.....	6
1.4	BLOCOS HAPLOTÍPICOS: DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	7
1.4.1	Desequilíbrio de ligação devido à miscigenação da população.....	8
1.4.2	Desequilíbrio de Ligação em populações miscigenadas: mapeamento por mistura.....	9
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	11
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	12
4.2	MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE UTILIZADOS.....	12
4.2.1	Determinação fenotípica (nomenclatura).....	12
4.2.2	Inserções <i>Alu</i> (APO e PV92).....	12
4.3	GENOTIPAGEM DOS MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE.....	13
4.4	TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	13
4.4.1	Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	13
4.4.2	Estimativas das frequências alélicas e genotípicas.....	15
4.4.3	Associações par-a-par entre <i>loci</i> .....	15
4.4.4	Diferenciação genética das populações.....	16
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>

5.1 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS, ALÉLICAS E EQUILÍ- BRIO DE HARDY-WEINBERG E TESTE DE HOMOGENEIDADE.....	16
5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE <i>LOCI</i> NÃO LIGADOS .....	18
5.3 DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL.....	18
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
6.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	19
6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE <i>LOCI</i> NÃO LIGADOS.....	21
6.3 DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL.....	21
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>22</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>23</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>30</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Para entender a história e a evolução das populações humanas, duas grandes áreas da Genética se entrelaçam: a Genética de Populações, que estuda a origem e as forças evolutivas atuantes, e a Genética Molecular que utiliza a variabilidade genômica como ferramenta para inferir cenários evolutivos passados. Esta variabilidade constitui a heterogeneidade do genoma humano, sendo tais regiões variáveis os polimorfismos genéticos que, quando utilizados em estudos genômicos são denominados marcadores moleculares (CAVALLI-SFORZA, 1998).

Hoje, com o advento da engenharia genética e o sequenciamento completo do genoma humano, diversos marcadores moleculares foram caracterizados e podem ser classificados em três grandes grupos: os polimorfismos de sequência, tais como os SNPs (do inglês, *Single Nuclotide Polymorphism*) (SACHIDANANDAM *et al.*, 2001), os microssatélites (TAUTZ, 1989) e os polimorfismos de inserção e deleção (INDELs, do inglês, *Insertion/Deletion*) (WEBER *et al.*, 2002).

A genética de populações humanas tem sido um campo ativo e envolvente desde 1900, quando os únicos marcadores genéticos até então descritos eram os grupos sanguíneos (sistema ABO) e uns poucos polimorfismos proteicos. Naquela época, foi intrigante perceber como os padrões de polimorfismos se distribuíam entre as culturas humanas, frequentemente refletindo as grandes divisões continentais e as ondas de migrações passadas. Entendia-se que o acúmulo de dados genéticos tornaria essas inferências mais robustas e precisas (HARTL e CLARK, 2010).

Nos últimos anos, a genética de populações humanas tem sofrido um significativo aumento no volume de dados gerados sobre os genes humanos e suas variações, especialmente após a publicação do Projeto Genoma Humano. Outro importante estímulo foi a ideia de que os genes responsáveis por muitas doenças genéticas poderiam ser mapeados simplesmente por sua associação estatística a genótipos com funções desconhecidas, ao longo do genoma. Essa ideia de mapeamento por associação converteu-se em um esforço para detectar, mapear e caracterizar polimorfismos humanos em diversas populações distintas (HARTL e CLARK, 2010).

Diversas aplicações práticas deste tipo de pesquisas merecem destaque: o mapeamento genético e identificação de genes de

suscetibilidade a doenças em humanos, incluindo câncer de mama, artrite reumatoide, lúpus e psoríase.

## 1.1 População Brasileira como modelo tri-híbrido

A população brasileira é produto da miscigenação entre três principais grupos étnicos: ameríndios, europeus e africanos. O descobrimento da América pelos europeus, no século XV, promoveu uma onda migratória intensa envolvendo pelo menos dois continentes doadores (Europa e África) e tendo América como receptora de tais etnias.

O componente africano na população brasileira foi atribuído à prática escravista que teve início por volta de 1538 e se manteve por aproximadamente 350 anos (SALZANO e FREIRE-MAIA, 1970 apud MUNIZ *et al.*, 2008). Durante este período, milhares de escravos foram embarcados no litoral atlântico da África, em diversos locais da costa que se estende do Senegal ao sul de Angola e ao norte da Namíbia e também no litoral da África Oriental, de Moçambique à Somália. Estes entraram no país principalmente pelo Maranhão, Bahia, Rio de Janeiro e Pernambuco, sendo posteriormente distribuídos para as demais regiões (TAVARES, 1988 apud MUNIZ *et al.*, 2008).

Estima-se que até 1880, tenham sido trazidos para o continente americano pelo menos 10 milhões de africanos. A migração em massa de europeus e de africanos promoveu padrões genéticos diferentes, sendo observados apenas nas gerações seguintes, havendo o estabelecimento de populações com vários tipos e graus de mistura em toda América. Além disso, a migração em massa promoveu também mudanças demográficas, havendo redução da população nativa em aproximadamente 90% do que existia à época do início da colonização (BEDOYA *et al.*, 2006).

Os grupos indígenas do litoral brasileiro encontrados pelos portugueses eram principalmente tribos do tronco Tupi. Somavam cerca de um milhão de índios, divididos em dezenas de tribos, compreendendo 300 a 2000 habitantes em cada aldeia (RIBEIRO, 1997 apud MUNIZ *et al.*, 2008). Os primeiros habitantes das terras que hoje correspondem à Santa Catarina foram indígenas que podem ser identificados em relação ao tronco linguístico em dois grandes grupos: Tupi-Guarani (Guarani) e Macro Gê (Kaingang e Xokleng) ([www. http://www.ethnologue.com](http://www.ethnologue.com)).

A bibliografia relativa aos Guarani é provavelmente a mais vasta das tribos brasileiras, uma vez que desde o século XVI eles têm sido



objeto de inúmeras obras descritivas e que atualmente compõem um dos mais numerosos registros de povos indígenas sul-americanos (MARRERO *et al.*, 2007). Dominavam as florestas subtropicais do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Misiones (Argentina), assim como as florestas tropicais de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraguai e Bolívia. Os Guaraní do Brasil Central podem ser divididos de acordo com diferenças linguísticas e peculiaridades da cultura material em três grandes grupos: Nandeva, Kaiowá e M'Byá (MARRERO *et al.*, 2007).

O declínio da população Guaraní ocorreu através de causas não muito diferentes daquelas que vitimaram outras populações nativas: a escravidão imposta pelo governo militar espanhol nas reduções depois da expulsão dos Jesuítas e da mestiçagem entre mulheres Guaraní com homens não indígenas, assim como, a introdução de novas doenças de origem europeia ou africana, associadas a ataques de bandeirantes, além da Guerra Guaranítica (SCHIAVETTO, 2003).

No século XV, Portugal necessitava de um grande contingente de pessoas para ocupar a colônia, evitando perder estas terras para a Espanha, a atenção das autoridades voltou-se para as ilhas atlânticas – Açores e Madeira, que sofriam uma forte crise de subsistência devido à densidade populacional elevada e, portanto, havia desejo destes ilhéus em partir. O edital do rei estimulando as famílias a emigrarem deixava claro o de Portugal propósito de ocupação do território, através de uma colonização de base estável (FLORES, 2000 apud MUNIZ *et al.*, 2008).

Desta forma, dois problemas puderam ser resolvidos de uma única vez, a crise de subsistência no arquipélago e a ocupação do sul do Brasil. Além de portugueses, o Brasil recebeu imigrantes de outros países como: italianos, alemães, espanhóis, poloneses, japoneses e sírio-libaneses que saíam de seus países em busca de melhores condições de vida nas Américas. Estima-se que cerca de 15 milhões de europeus tenham cruzado o Atlântico até 1880 sendo que entre 1881 a 1915 o número de imigrantes alcançou seu apogeu, chegando a cerca de 31 milhões de indivíduos (KLEIN, 2000 apud MUNIZ *et al.*, 2008).

É importante salientar que outros grupos étnicos contribuíram para a formação da população brasileira. Este processo migratório que perdura há mais de cinco séculos culminou na atual composição da população brasileira e implicou não somente alterações nas composições genéticas inerentes à miscigenação, como também na inserção de diferentes culturas e costumes. A população catarinense segue o mesmo padrão, como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Composição Étnica da População de Santa Catarina – IBGE/2008

Composição Étnica de Santa Catarina – em porcentagem

IBGE/2008	Declarados brancos	Declarados Pardos	Declarados Negros	Declarados Asiáticos
Santa Catarina	86,96	9,98	2,63	0,43

## 1.2 Estrutura populacional

Um dos desafios nos estudos genéticos é usar a pequena quantidade de diferenciação genética entre populações para inferir a história das migrações humanas. As diferenças genéticas entre as populações humanas derivam principalmente de gradações nas taxas de frequências alélicas a partir de genótipos distintos. A estrutura populacional foi identificada a partir da acumulação de diferenças de pequenas frequências alélicas através de muitos *loci* (ROSENBERG *et al.*, 2002).

Do ponto de vista genético, a estruturação na população humana é determinada por padrões de acasalamento e reprodução. Grandes distâncias físicas e barreiras geográficas (por exemplo, altas montanhas, grandes desertos e grandes massas de água) impõem obstáculos à comunicação humana e interação, levando a padrões de reprodução endogâmicos (ou seja, dentro de grupos) resultando em uma subestruturação genética que segue em grande parte das linhas geográficas (HARTL e CLARK, 2010).

As duas últimas décadas de pesquisa em genética de população tem demonstrado que a maior diferenciação genética em uma população ocorre entre grupos separados continentalmente. A reprodução endogâmica dentro dos continentes deu origem a novas subdivisões, muitas vezes correspondendo a grupos étnicos. Esta subdivisão está novamente atribuída parcialmente à geografia, mas também está associada com fatores sociais, incluindo a religião, cultura, língua, e outras fontes de identificação de grupo (HARTL e CLARK, 2010).

Assim, grupos étnicos são geneticamente diferenciados, dependendo da extensão da reprodução, isolamento e endogamia, mas geralmente essa diferença é menor do que em grupos continentalmente separados (BURCHARD *et al.*, 2003).

A estratificação populacional pode ser definida como a diferença nas frequências alélicas de uma subpopulação devido ao fator ancestral. Em geral, a estratificação da população ocorre quando a população total é formada por miscigenação entre subpopulações e quando as

proporções de mistura (proporções do genoma que têm ascendência de cada subpopulação) variam entre os indivíduos (HOGGART *et al.* 2003).

A estruturação populacional está relacionada ao risco de associações espúrias em estudos de caso/controle devido a diferenças nas frequências alélicas entre as subpopulações constituintes do pool gênico de uma população. Três fatores podem levar à sobre-representação de um grupo entre os casos: o primeiro refere-se ao risco inerente de que um alelo seja falsamente associado ao fenótipo, caso ele seja mais frequente na população de casos. O segundo fator é a penetrância diferencial devido a variações ambientais, onde alguns subgrupos podem ter maior penetrância do genótipo causal devido a pressões ambientais diversas, tais com hábitos alimentares. A terceira variante está relacionada ao viés de averiguação, ou seja, quando há diferenças na amostragem dos indivíduos constituintes do estudo devido a fatores não genéticos como acesso à saúde pública, local de moradia ou erros de amostragem. Métodos de análise recentes e a possibilidade de genotipar um grande número de marcadores permitem hoje estimar componentes de miscigenação visando diminuir o impacto da estratificação populacional nos estudos de associação de genes a doenças (TARAZONA-SANTOS *et al.*, 2007).

Apesar de grandes projetos de pesquisa, como o *HapMap Project* ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) e *1000Genomes* (<http://www.1000genomes.org>) estarem atualmente comprometidos na realização de estudos de varredura genômica, seus esforços estão majoritariamente voltados para populações européias, algumas africanas e outras asiáticas, sendo o conhecimento adquirido a respeito da variabilidade genômica praticamente limitado a estas e, posteriormente, extrapolado para outras que não estão sendo extensivamente estudadas, como as da América Latina (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2007).

### 1.3 Marcadores Moleculares

Os SNPs consistem na variação de um único nucleotídeo na sequência de DNA. Os diferentes mecanismos de mutação podem gerar dois tipos de substituições de bases: as transições, quando ocorre troca de uma purina por outra purina (A<->G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C<->T); e as transversões, quando ocorre troca de uma purina por uma pirimidina ou de uma pirimidina por uma purina (A<->C, A<->T, G<->C, G<->T) (IGNAL *et al.*, 2002)

Ao longo dos anos, estudos têm demonstrado que muitos SNPs distribuídos através do genoma possuem variações nas suas frequências alélicas entre duas ou mais populações continentais. (MAO *et al.*, 2007; PRICE *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2004; TIAN *et al.*, 2006; TIAN *et al.*, 2007). Portanto, eles podem agir como marcadores biológicos, ajudando cientistas a localizar genes que são associados à doenças. Quando SNPs ocorrem em regiões gênicas ou de regulação, podem desempenhar funções diretamente ligadas à doença, podendo afetar as funções deste gene.

Os INDELs são polimorfismos, normalmente bialélicos, causados pela ausência ou presença de um ou mais nucleotídeos na sequência de DNA. Embora ocorram em uma frequência não tão alta quanto os SNPs, os INDELs vêm sendo reconhecidos como uma abundante fonte de variabilidade genética por estarem amplamente espalhados por todo o genoma humano e corresponderem a cerca de 20% de todos os polimorfismos humanos (MILLS *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Marcadores Informativos de Ancestralidade

BODMER e CAVALLI-SFORZA 1971 demonstraram que a frequência de algumas variantes genéticas é diferente entre populações e/ou regiões distintas. Aquelas variantes cujo diferencial de frequência alélica (30%) foram denominados alelos específicos de população (SHRIVER *et al.*, 1997). Hoje conhecidos como Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs, do inglês, *Ancestry Informative Marker*), que são *loci* (SNPs, microssatélites, inserções/ deleções, entre outros) que apresentam alelos com significantes diferenças de frequência entre populações de regiões distintas geograficamente (MARTINEZ-FIERRO *et al.*, 2009). Eles atualmente utilizados para o controle da estratificação populacional.

Os AIMs são aplicados em diversas áreas de estudo, incluindo a genética de populações, ciências forenses, genética médica e outros. Em genética populacional, os AIMs podem ser usados para estimar as proporções de mistura, diferenciação populacional, e diversidade genética, fornecendo informações detalhadas sobre a variabilidade genética das populações de estudo (HALDER *et al.*, 2008; REICH e GOLDSTEIN, 2001; CHEN *et al.* 2003).

A capacidade de atribuir ancestralidade a segmentos cromossômicos em uma população miscigenada depende de: (1) marcadores com grandes diferenças de frequência entre as populações

ancestrais contribuintes, (2) à aproximação do número de gerações e/ou modelo de mistura e (3) um mapa suficientemente denso de marcadores informativos. Estas condições não são independentes porque, por exemplo, o número de gerações desde a mistura e o conteúdo as informações de cada marcador irá determinar a densidade de marcadores necessários para conferir com precisão ascendência para blocos cromossômicos (SELDIN *et al.*, 2004).

Estudos de associação geral têm sido criticados por causa de seu poder significativamente diminuído na presença de heterogeneidade alélica, uma vez que a heterogeneidade alélica é susceptível de ser muito comum em doenças genéticas complexas. O mapeamento por miscigenação tem o potencial para mapear genes que, dentro de uma população não miscigenada, não são suficientemente polimórficos para ser detectados por estudos de ligação ou associação (COLLINS-SCHRAMM *et al.*, 2002).

#### **1.4 Blocos haplotípicos: Desequilíbrio de ligação**

Os cromossomos são constituídos por vários blocos genômicos, de tamanhos variáveis, que podem apresentar alto grau de desequilíbrio de ligação e serem então denominados blocos haplotípicos. Chama-se desequilíbrio de ligação (LD, do inglês *linkage disequilibrium*), a ocorrência, na população, de uma frequência maior de uma determinada combinação entre dois genes, do que a esperada pelo produto de suas frequências individuais (HARTL e CLARK, 2010).

O desequilíbrio de ligação é dependente da taxa de recombinação e quanto maior a taxa de recombinação, mais rápida será a aproximação do equilíbrio entre os dois *loci*. O LD é um aspecto importante em estudos de associação genética e é gerado em uma população principalmente por meio de um processo de miscigenação (HARTL e CLARK, 2010). Associações alélicas devido ao LD são significativas e estão correlacionadas com a distância física dentro de pequenas regiões genômicas, mas há uma deterioração dessas associações ao longo do tempo devido à recombinação (JORDE, 1995; HUTTLEY, 1999; ARDLIE, 2002).

O LD é um importante conceito utilizado para rastrear alelos que possuem relação com risco de doença. No entanto, quanto à definição de métodos estatísticos para mapeamento de doenças genéticas usando LD (RISCH, 1996; PRITCHARD, 2001; WEISS, 2002), em grandes populações cosmopolitas, o LD pode ser difícil de detectar quando a

mutação é antiga, pois a quantidade de LD restante pode ser pequena (WINKLER, 2010). Além disso, as associações de falso-positivos devido à estratificação da população são importantes fatores de confusão em estudos de associação baseada em LD (HALDER e SHRIVER, 2003).

O tamanho dos blocos haplotípicos variam e depende de fatores genômicos como, por exemplo, a existência de *hot-spots* de recombinação (GABRIEL, *et al.*, 2002). Os cromossomos de indivíduos miscigenados são constituídos da junção de blocos haplotípicos sendo cada um proveniente de uma população parental específica (TANG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2010), ou seja, cromossomos dos indivíduos miscigenados constituem verdadeiros mosaicos de longos fragmentos com diferentes ancestralidades (blocos ancestrais) (ROSENBERG *et al.*, 2010). Além disso, o processo de miscigenação gera um adicional e temporário desequilíbrio de ligação (não encontrado nas populações parentais), que abrange grandes extensões dos cromossomos (até 15 cM), gerando longos segmentos que são herdados de maneira intacta das populações parentais (COLLINS-SCHRAMM *et al.*, 2003).

A distribuição dos tamanhos dos blocos ancestrais depende de fatores como o tempo de mistura das populações parentais e taxa de recombinação e podem ser informativos acerca da história evolutiva da população (TANG *et al.*, 2005, WINKLER, 2010). Deste modo, é possível inferir a origem ancestral de um segmento cromossômico a partir da combinação da informação de múltiplos locos informativos de ancestralidade (AIMs, do inglês *ancestry informative markers*) ao longo da região de interesse com a informação do desequilíbrio de ligação gerado pela mistura (SELDIN *et al.*, 2004). A necessidade da densidade de marcadores dependerá da complexidade da estrutura local do haplótipo e a distância ao longo do qual eles se estendem, sendo que nenhuma das quais ainda é bem definida (SACHIDANANDAM *et al.*, 2001).

#### **1.4.1 Desequilíbrio de ligação devido à miscigenação da população**

São descritos dois modelos de dinâmica de mistura para representar os extremos do processo pelo qual uma população miscigenada é formada: o modelo de gene de fluxo contínuo (CGF, do inglês *Continuous Gene Flow*) no qual a miscigenação ocorre imediatamente em uma única geração sem contribuição adicional de qualquer população parental. Portanto, o LD de miscigenação é gerado

em uma única geração e gradualmente se deteriora em gerações sucessivas, através da variedade independente e recombinação entre os *loci* (HARTL e CLARK, 2010).

Por outro lado, o modelo de isolamento híbrido (HI, do inglês *Hybrid Isolament*) representa uma situação onde a miscigenação ocorre a uma taxa constante em cada geração, com contribuições de uma, ou todas, as populações parentais na mistura da população. O LD por miscigenação sob o modelo CGF aumenta em cada geração, desde que a mistura esteja ocorrendo constantemente (HALDER e SHRIVER, 2003).

O processo de miscigenação cria inicialmente um LD entre todos os *loci* ligados e não ligados, que têm as frequências alélicas diferentes nas populações parentais. O desequilíbrio de ligação por miscigenação (ALD, do inglês *Admixture Linkage Disequilibrium*) em uma população miscigenada depende da frequência diferencial de alelos entre as populações parentais, o nível de miscigenação, a dinâmica de mistura, o tempo decorrido desde a miscigenação e a taxa de recombinação entre os *loci* (HALDER e SHRIVER, 2003).

Enquanto o ALD entre *loci* não ligados decai rapidamente (dentro de duas a quatro gerações), o ALD entre *loci* ligados leva mais tempo para diminuir. Assim, caso as populações parentais sejam diferentes em uma característica ou uma doença devido a diferentes frequências de alelos de risco, pode ser possível identificar os *loci* contendo estes alelos usando mapeamento por mistura (HALDER e SHRIVER, 2003). A duração, a direção e a taxa de fluxo gênico entre duas populações influenciam a proporção de mistura e o comprimento dos segmentos cromossômicos derivados das populações ancestrais, que irão variar entre os indivíduos (WINKLER, 2010).

#### **1.4.2 Desequilíbrio de Ligação em populações miscigenadas: mapeamento por mistura**

Caso exista diferença nas frequências alélicas entre dois grupos, então será esperado que a população que representa a miscigenação entre essas duas populações deva ter um desequilíbrio de ligação maior do que qualquer uma das populações parentais (WINKLER, 2010). Em afro-americanos, por exemplo, espera-se um maior desequilíbrio de ligação do que entre africanos (WINKLER, 2010).

Por meio dessa diferença de frequências é possível fazer uma afirmação probabilística sobre a população de origem mais provável

para uma região genômica. TANG *et al* (2005) formalizaram essa idéia para identificar a ancestralidade populacional de blocos específicos ao longo do genoma inteiro. A idéia do mapeamento de mistura é fazer isso para cada indivíduo na população miscigenada e então correlacionar o alelo que contenha um fator de risco genético para uma doença que possua uma maior ancestralidade compartilhada com a população cujo risco genético global é maior.

O mapeamento de mistura por desequilíbrio de ligação (MALD, do inglês *Mapping Admixture Linkage Disequilibrium*) indica que quando há mistura entre duas populações, o LD é inicialmente criado entre todos os *loci* que têm grandes diferenças nas frequências alélicas entre a população miscigenada e as parentais. Com sucessivas misturas nas gerações, o LD entre *loci* não ligados decai rapidamente. Assim, uma população recentemente miscigenada terá regiões muito maiores de LD entre *loci* que são vistos em uma população padrão (COLLINS-SCHRAMM *et. al*, 2002).

Métodos de mapeamento de mistura agregam potencial ao estudo de mapear genes de susceptibilidade a doenças genéticas complexas e a fenótipos. Esses métodos devem ser aplicáveis quando as distribuições de susceptibilidade de genes são diferentes para populações fundadoras e os genes de susceptibilidade permaneceram vinculados com alelos ou haplótipos exclusivos relativamente a um da população fundadora (SELDIN *et al.*, 2004).

O primeiro pressuposto da abordagem de MALD é que um conjunto de marcadores com diferença de frequência entre populações que possa ser identificado. Estes AIMs devem ser muito úteis tanto para a avaliação mais teórica do método de MALD quanto a aplicação real de MALD para estudos de doenças. O segundo requisito do método de MALD é que os AIMs podem ser usados para determinar a contribuição das populações parentais para cada região cromossômica da população miscigenada (COLLINS-SCHRAMM *et. al.*, 2002).

A capacidade de atribuir ancestralidade a segmentos cromossômicos em uma população miscigenada é dependente de: (1) marcadores com grandes diferenças de frequência entre as populações ancestrais contribuintes, (2) à aproximação do número de gerações e/ou modelo de mistura e (3) um mapa suficientemente denso de marcadores informativos. Estas condições não são independentes porque, por exemplo, o número de gerações desde a mistura e o conteúdo de informatividade de cada marcador irá determinar a densidade de



marcadores necessários para conferir com precisão ascendência para blocos cromossômicos. (SELDIN *et al.*, 2004, WINKLER, 2010).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Marcadores com grandes diferenças de frequência entre as populações parentais são especialmente informativos para estimar a miscigenação populacional e individual. O uso destes marcadores é desejável, pois permite a redução dos esforços de genotipagem. Estas estimativas permitem detectar estratificação populacional devido à miscigenação em estudos epidemiológicos.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Através de análises moleculares, verificar associação entre os dois grupos, descartando possíveis associações espúrias, em dois grupos amostrais, uma contendo indivíduos com a doença artrite e outra com indivíduos que não tinham a doença.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Padronizar a utilização dos marcadores informativos de ancestralidade escolhidos para este estudo: APO e PV92.
- Genotipar os marcadores selecionados em amostras de indivíduos diagnosticados com Artrite Reumatoide e indivíduos sem histórico de doenças.
- Verificar associação entre os dois grupos, descartando possíveis associações espúrias.
- Verificar a dinâmica do processo de mistura étnica entre os diferentes grupos.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Dois marcadores foram selecionados com base em sua independência (marcadores não ligados, evitando a redundância da informação) e a informatividade de ancestralidade (Ia), que quantifica a informação sobre a ancestralidade de um indivíduo fornecida pelo genótipo em um determinado *locus* (ROSENBERG *et al.*, 2010).

## 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída de 100 pacientes diagnosticados com Artrite Reumatoide, atendidos pelo Hospital Universitário que foram pareados por sexo e idade com 100 indivíduos-controles, sem diagnóstico nem histórico familiar para a patologia em estudo, que são participantes de projetos realizados paralelamente pela equipe do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE/UFSC).

Os dados epidemiológicos e familiares dos pacientes e dos indivíduos-controles foram obtidos através de entrevistas realizadas com questionários estruturados (**Apêndices A e B**), após a assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecidos (TCLEs) pelos voluntários (**Apêndices C e D**). Após as entrevistas, amostras de sangue periférico (cerca de 8 ml) foram coletadas através de punção venosa, para extração do DNA genômico e obtenção dos dados genéticos, e armazenadas e transportadas a 4°C para o posterior processamento no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE/UFSC).

As amostras biológicas e os questionários obtidos nessa pesquisa foram catalogados e constituem um banco de dados e amostras, de pacientes com artrite e de indivíduos-controles, armazenado no LAPOGE. O protocolo de extração de DNA genômico e PCR utilizados neste trabalho estão no **Apêndice E**.

## 4.2 MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE UTILIZADOS

### 4.2.1 Determinação fenotípica (nomenclatura)

Para os AIMs analisados no presente estudo a denominação dos alelos foi feita seguindo a convenção estabelecida em PARRA *et al.* (1998), onde o alelo \*1 (por ex., APO\*1) é o fragmento correspondente à banda de maior peso molecular observada no gel de agarose, devido à presença de uma inserção ou inserção *Alu* (para os *loci* APO e PV92).

### 4.2.2 Inserções *Alu* (APO e PV92)

Comprimentos dos fragmentos, localização citogenética e sequencia dos *primers* do APO como do PV92 está na tabela 2. O *locus Alu* APO (rs3138522) está próximo ao complexo de genes da apolipoproteína AI-CIII-AIV. A presença da inserção *Alu* gera um

fragmento de aproximadamente 400pb e caracteriza o alelo APO\*1, frequente em nativos americanos e europeus.

No *locus* *Alu* PV92 (rs3138523) a caracterização do alelo PV92\*1 dá-se pela presença da inserção *Alu* que gera um fragmento de aproximadamente 400pb, mais prevalente em populações nativo americanas (LUIZON *et al.*, 2008).

**Tabela 2:** Comprimentos dos fragmentos, localização citogenética e sequência dos *primers* dos dois AIMs analisados.

Locus	Tipo	Localização	Sequência dos <i>Primers</i> (5'-3')*	Alelo e Tamanho dos fragmentos (pb)*
APO	Inserção <i>Alu</i>	11q23	AAGTGCTGTAGGCCATTAGATTAG AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA	1: ~ 400 2: ~ 100
PV92	Inserção <i>Alu</i>	16q23.3	AACTGGGAAAATTGAAGAGAAAG T TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG	1: ~ 400 2: ~ 130

\*LUIZON *et al.*, 2007

## 4 3 GENOTIPAGEM DOS MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE

A genotipagem dos dois AIMs selecionados foi realizada através da amplificação dos fragmentos desejados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

### 4.4 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

#### 4.4.1 Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e Teste de Homogeneidade.

Segundo o teorema de Hardy-Weinberg as frequências genotípicas esperadas no equilíbrio podem ser estimadas a partir da expansão do seguinte binômio:

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

Onde:

$x_i^2$  é a frequência esperada dos homozigotos do alelo i;

$2x_i x_j$  é a frequência esperada do heterozigoto ij;

$x_j^2$  é a frequência esperada dos homozigotos para o alelo j.

A aderência das frequências genótípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada através do programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995a). Foram realizados três testes baseados na hipótese nula de união aleatória dos gametas: teste exato de probabilidade, teste para detecção da deficiência e para detecção do excesso de heterozigotos.

No teste exato de probabilidade, o valor de  $p$  corresponde à soma de probabilidades de todas as tabelas com probabilidade menor ou igual ao observado. O segundo e o terceiro são testes mais sensíveis do que o de probabilidade e utilizam uma hipótese alternativa ( $H_1$ ) de excesso ou de deficiência de heterozigotos, respectivamente.

Para verificar se duas amostras são homogêneas quanto às proporções encontradas dos diferentes fenótipos, foi utilizado o quadrado de Homogeneidade, de acordo com a seguinte equação:

$$\chi^2 = \sum \left( \frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}} \right)$$

Onde:

Observado é a frequência do fenótipo observado.

Esperado é a frequência do fenótipo esperado por meio da equação: Total da linha X Total da coluna / Total Geral.

O Qui-Quadrado é feito para testar a  $H_0$  (hipótese nula): Não há diferenças entre o observado e esperado (Neste caso quer dizer que ambas as amostras são homogêneas e, portanto, podem ser analisadas juntas, como se fossem uma única).

Depois é feito o cálculo dos graus de liberdade para saber se o valor do Qui-quadrado calculado aceitará a  $H_0$ , segundo a fórmula abaixo:

$$GL = (\text{número de linhas} - 1) \times (\text{número de colunas} - 1)$$

Com o grau de liberdade calculado, verificar na tabela do Qui-Quadrado tabelado (Apêndice G), com a probabilidade de 0,05 e comparar o valor do Qui-quadrado calculado com o da tabela. Caso o Qui-Quadrado calculado for menor que o da tabela, aceita-se a  $H_0$ .

#### 4.4.2 Estimativas das frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas ( $x_i$ ) e genotípicas ( $X_{ii}$ ) de cada *locus*, em indivíduos com artrite e controles foram estimadas utilizando-se o programa GENEPOP® (RAYMOND e ROUSSET, 1995a) versão 3.4 (disponível em <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>), de acordo com as seguintes equações:

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \quad X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n}$$

Onde:

$x_i$  é a frequência do alelo “i”;

$X_{ii}$  é a frequência do genótipo “ii”;

$n_{ii}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i, respectivamente;

$n$  corresponde ao número de indivíduos analisados.

#### 4.4.3 Associações par-a-par entre loci

A análise de LD foi realizada utilizando-se o programa GENEPOP®, versão 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995a). A hipótese nula é a de que a distribuição genotípica em um *locus* é independente da distribuição em outro *locus*. A verificação da ocorrência não aleatória de certas combinações alélicas foi realizada pela seguinte fórmula:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - p_a p_b$$

Onde:

$\Delta_{ab}$  é o valor do desequilíbrio de ligação;

$P_{ab}$  é a frequência observada de um haplótipo;

$P_a$  é a frequência observada do alelo a de um dado *locus*;

$P_b$  é a frequência observada do alelo b de um outro *locus*;

$P_a P_b$  é a frequência esperada de um haplótipo ab.

O desequilíbrio de ligação pode assumir valores no intervalo de -1,0 a +1,0, sendo que os valores negativos indicam a repulsão entre os

alelos em questão, os valores positivos indicam o acoplamento e, o valor zero indica a ausência de desequilíbrio de ligação.

#### 4.4.4 Diferenciação genética das populações

Os testes exatos para diferenciação populacional foram realizados com o uso do programa GENEPOP® 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995a). Este utiliza Tabelas de contingência RxC geradas automaticamente para cada *locus*, em que R é o número de populações e C é o número de alelos no *locus*. Este procedimento compara cada *locus* em pares de populações, para determinar se existem diferenças nas frequências alélicas e genotípicas observadas, onde a hipótese nula testada é a de que a distribuição alélica é idêntica entre as populações (RAYMOND e ROUSSET, 1995b).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Frequências genotípicas, alélicas e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas e genotípicas de cada um dos dois AIMs (APO e PV92) (Tabela 3 e 4).

**Tabela 3:** Frequências alélicas e genotípicas APO

<b>Locus APO</b>	<b>Casos (AR)</b>	<b>Controles (PSC)</b>
<b>Ins</b>	152 (0,760)	192 (0,960)
<b>Del</b>	48 (0,240)	8 (0,040)
<b>Total de Alelos</b>	200	200
<b>Ins/Ins</b>	63 (0,577)	93 (0,921)
<b>Ins/Del</b>	26 (0,366)	6 (0,078)
<b>Del/Del</b>	11 (0,057)	1 (0,001)
<b>Total de indivíduos</b>	100	100

**Tabela 4:** Frequências alélicas e genotípicas PV92

<b>Locus PV92</b>	<b>Casos (AR)</b>	<b>Controles (PSC)</b>
<b>Ins</b>	91 (0,460)	58 (0,290)
<b>Del</b>	107 (0,540)	142 (0,710)
<b>Total de Alelos</b>	198	200
<b>Ins/Ins</b>	41 (0,208)	12 (0,083)
<b>Ins/Del</b>	9 (0,504)	34 (0,414)
<b>Del/Del</b>	49 (0,288)	54 (0,503)
<b>Total de indivíduos</b>	99	100

As frequências genotípicas dos dois AIMs foram comparadas aos valores esperados pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5) utilizando as frequências genotípicas esperadas (Tabela 6 e 7).

**Tabela 5:** Valores de  $p$  para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. (Valores em equilíbrio quando  $p > 0,05$ ).

<b>População</b>	<b>APO</b>	<b>PV92</b>
<b>AR</b>	0,0057	0,0000*
<b>PSC</b>	0,1364	0,0884

\* Valor fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg

**Tabela 6:** Tabela com frequência absoluta e esperada do marcador APO.

Genótipo	Frequência Absoluta <b>AR</b>	Frequência Absoluta <b>PSC</b>	Total	Desvio amostral <b>AR</b>	Desvio amostral <b>PSC</b>
In/In	63 (78)	93 (78)	156	2,8846	2,8846
In/Del	26 (16)	6 (16)	32	6,25	6,25
Del/Del	11 (6)	1 (6)	12	4,1666	4,1666
Total	100	100	200	$X^2_{(0,05)} = 26,6025$	

**Tabela 7:** Tabela com frequência absoluta e esperada do marcador PV92.

Genótipo	Frequência Absoluta <b>AR</b>	Frequência Absoluta <b>PSC</b>	Total	Desvio amostral <b>AR</b>	Desvio amostral <b>PSC</b>
In/In	41 (26,3668)	12 (26,6331)	53	8,1212	8,0399
In/Del	9 (21,3919)	34 (21,6080)	43	7,1783	8,5698
Del/Del	49 (51,2412)	54 (51,7587)	103	0,0980	0,2729
Total	99	100	199	$X^2_{(0,05)} = 32,2801$	

## 5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE *LOCI* NÃO LIGADOS

Associações significativas entre *loci* não ligados são indicativas de desequilíbrio de ligação por mistura recente (ALD, do inglês *Admixture Linkage Disequilibrium*) (PFAFF *et al.*, 2001) e sugerem a presença de estrutura genética, razão pela qual foi analisado o padrão de associações par a par entre os AIMs não ligados.

## 5.3 DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL

A diferenciação genética (alélica e genotípica) entre as populações de casos (AR) e controles (PSC) está descrita na tabela 8.



**Tabela 8:** Valores de  $p$  para diferenciação alélica e genotípica entre as populações de casos (AR) e controles (PSC).

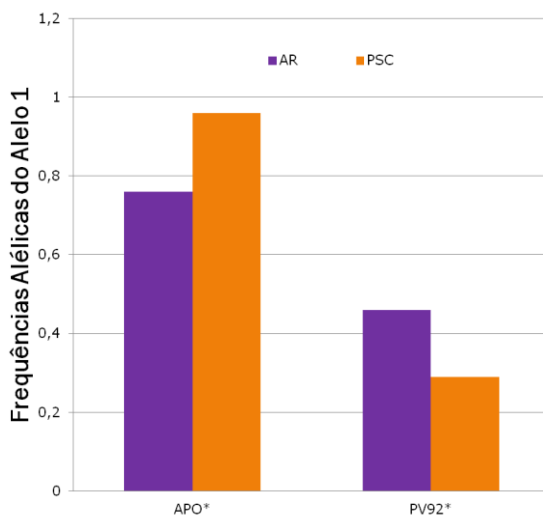
<i>Loci</i>	Diferenciação alélica AR X PSC	Diferenciação genotípica AR X PSC
<b>APO</b>	0	0
<b>PV92</b>	0,00072	0,00618

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG E TESTE DE HOMOGENEIDADE

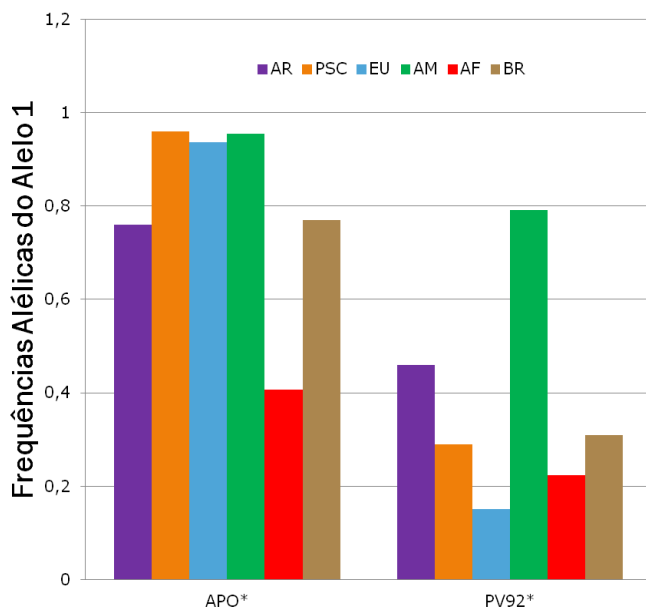
A frequência do alelo 1 do marcador APO foi maior no grupo amostral PSC do que o de controle, como mostra a figura 1. Em relação ao marcador PV92, foi o grupo amostral AR que teve uma frequência maior.

**Figura 1:** Gráfico com as frequências do alelo 1 para os dois marcadores genéticos nos dois grupos amostrais.



Das frequências alélicas dos dois AIMs aqui analisados, o marcador APO no grupo amostral PSC apresenta as frequências próximas (0,960 – presente estudo) entre europeus (0,937 - BRUM *et al.*, 2013) e ameríndios (0,996 - MUNIZ *et al.*, 2008), contudo para esse marcador, foi o grupo amostral AR que teve a frequência (0,760 – presente estudo) mais próxima da população brasileira (0,770 - SHRIVER *et al.*, 2003) Já o marcador PV92 no grupo amostral PSC apresenta uma frequência (0,290 – presente estudo) próxima da brasileira (0,310 - SHRIVER *et al.*, 2003), como mostra a figura 2.

Figura 2: Gráfico com as frequências do alelo 1 para os dois marcadores genéticos nos dois grupos amostrais comparados com a literatura.



Frequências retiradas da literatura: EU – BRUM *et al.*, 2013; AM – MUNIZ *et al.*, 2008; AF – PARRA *et al.*, 1998; BR – SHRIVER *et al.*, 2003.

Quando comparadas as frequências alélicas dos dois AIMs nas populações de controles deste trabalho, foram encontradas frequências semelhantes (APO 0,960 – presente estudo; 0,942 e 0,951 - ZEMBRZUSKI *et al.*, 2006) (PV92 0,290 – presente estudo; 0,310 e 0,258 - BRUM *et al.*, 2013) em outros dois estudos brasileiros

(Apêndice F), sendo o primeiro envolvendo pacientes com Doença Arterial Coronariana e controles sem histórico de doença (ZEMBRZUSKI *et al.*, 2006) e o segundo estudo envolvendo dois grupos de pacientes (um grupo diagnosticado com Neuromielite Óptica e o outro com Esclerose Múltipla) e seus controles sem histórico de doença (BRUM *et al.*, 2013).

Considerando as duas populações de casos e controles aqui analisadas (AR e PSC) e os *loci* estudados, houve um desvio para o EHW ( $p < 0,050$ ) que foi observado no grupo amostral de casos (AR), o marcador PV92 ( $p = 0,0000$ ). O desvio observado poderia ser explicado por erro de genotipagem.

Foi realizado o Qui-Quadrado de homogeneidade, e tanto para o marcador APO como para o PV92, foi rejeitada a  $H_0$ , ou seja, os dois grupos amostrais não são homogêneos quanto às classes fenotípicas. Para APO o  $X^2$  calculado (26,6025) foi bem maior do que o  $X^2$  tabelado (5,99), sendo que foram os heterozigotos (6,25 e 6,25) que mais contribuíram para o grupo amostral estar fora do equilíbrio. Para PV92 o  $X^2$  calculado (32,2801) foi bem maior do que o  $X^2$  tabelado (5,99), sendo que foram tanto os homozigotos de inserção (8,12 e 8,03) como os heterozigotos (7,17 e 8,56) que contribuíram para o grupo amostral ficar fora do equilíbrio.

## 6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE *LOCI* NÃO LIGADOS

O fluxo gênico entre populações geneticamente distintas gera ALD entre os *loci* (ligados e não ligados) que possuem diferentes frequências alélicas (HARTL e CLARK, 2010). Associações entre *loci* não ligados sugere miscigenação recente, sendo considerada tão mais recente quanto maior for ALD. Não foram observadas associações entre os *loci* para a população de casos e para a de controle.

## 6.3 DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL

A partir de testes exatos, foram encontradas diferenças alélicas e genotípicas entre as duas populações estudadas, ou seja, o valor de  $p < 0,05$  tanto para a diferenciação alélica (APO – 0; PV92 – 0,00072) como para a populacional (APO – 0; PV – 0,00618). Portanto, rejeita-se a hipótese de que os alelos e genótipos possuem a mesma distribuição em casos e controles, corroborando os dados anteriores que mostram que os dois grupos amostrais são diferentes.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As perspectivas incluem a incorporação de um número maior de AIMs para refinar as estimativas aqui apresentadas, auxiliar outros trabalhos que utilizem AIMs, aumentar o número de marcadores em futuros trabalhos do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE/UFSC), aumentar o número de amostras a serem genotipadas

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARDLIE, K. G., KRUGLVAK, L., SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 4, p. 299-309, 2002.

BEDOYA, G.; MONTOYA, P.; GARCIA, J.; SOTO, I.; BOURGEOIS, S.; CARVAJAL, L.; LABUDA, D.; ALVAREZ, V.; OSPINA, J.; HEDRICK, P.W.; RUIZ-LINARES, A. Admixture dynamics in Hispanics: A shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 19, p. 7234-9, 2006.

BODMER, W.F., CAVALLI-SFORZA, L. L.; HENDRICK, A. E. Fear of enlightenment. **Nature**, v.229, n. 5279, p. 72-1, 1971.

BRUM, D. G.; LUIZON, M. R.; SANTOS, A. C. *et al.* European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 3,p. e58925, 2013.

BURCHARD, E. G.; ZIV, E.; COYLE, N. *et al.* The importance of race and ethnic background in biomedical research and clinical practice. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 12, p. 1170-5, 2003.

CAVALLI-SFORZA, L. L. The DNA revolution in population genetics. **Trends in genetics: TIG**, v. 14, n. 2, p. 60-5, 1998.

CHEN, H.; ZHU, X.; ZHAO, H.; ZHANG, S. Qualitative Semi-Parametric Test for Genetic Associations in Case-Control Designs Under. **Annals of human genetics**, v. 2, p. 250-264, 2003.

COLLINS-SCHRAMM, H. E., CHIMA, B., OPERARIO, D. J., CRISWELL, L., SELDIN, M. F. Markers informative for ancestry demonstrate consistent megabase-length linkage disequilibrium in the African American population. **Human genetics**, v. 113, n. 3, p. 211-219, 2003.

COLLINS-SCHRAMM, H. E.; PHILLIPS, C. M.; OPERARIO, D. J. *et al.* Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture linkage disequilibrium. **American journal of human genetics**, v. 70, n. 3, p. 737-50, 2002.

DEBORTOLI, G. **Identificação de quarto marcadores informativos de ancestralidade para fins de estudos de caso-controle**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

FLORES, M. B. R. Povoadores da fronteira: os casais açorianos rumo ao sul do Brasil. Florianópolis: UFSC, 2000.

GABRIEL, S. B., SCHAFFNER, S. F., NGUYEN, H., MOORE, J. M., ROY, J., BLUMENSTIEL, B., HIGGINS, J., DEFELICE, M., LOCHNER, A., FAGGART, M., LIU-CORDERO, S. N., ROTIMI, C., ADEYEMO, A., COOPER, R., WARD, R., LANDER, E. S., DALY, M. J., ALTSHULER, D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2225-2229, 2002.

HALDER, I.; SHRIVER, M.; THOMAS, M.; FERNANDEZ, J. R.; FRUDAKIS, T. A panel of ancestry informative markers for estimating individual biogeographical ancestry and admixture from four continents: utility and applications. **Human mutation**, v. 29, n. 5, p. 648-58, 2008.

HALDER, I., SHRIVER, M. D. Measuring and using admixture to study the genetics of complex diseases. **Human genomics**, v. 1, n. 1, p. 52-62, 2003.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. Principles of population genetics. 4th ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts, 2010.

HOGGART, C.J.; PARRA, E.J.; SHRIVER, M.D.; BONILLA, C.; KITTLES, R.A.; CLAYTON, D.G.; MCLEIGUE, P.M. Control of confounding of genetic associations in stratified populations. **Am J Hum Genet.**, v. 72, p. 1492–1504, 2003.

HUTTLEY, G. A., SMITH, M. W., CARRINGTON, M., O'BRIEN, S. J. A Scan for Linkage Disequilibrium Across the Human Genome. **Genetics**, v. 152, p. 1711-1722, 1999.

JORDE, L. B. Linkage disequilibrium as a gene-mapping tool. **Am J Hum Genet.**, v. 56, n.1, p. 11-14, 1995.

KLEIN, H.S. Migração internacional na história das Américas. In Fausto, B. Fazer a América. Ed. Universidade de São Paulo, p 13-31, 2000.

LUIZON, M. R.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DE OLIVEIRA, S. F. *et al.* Ancestry informative markers in Amerindians from Brazilian Amazon. **American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council**, v. 20, n. 1, p. 86-90, 2008.

LUIZON, M. R. **Dinâmica da Mistura Étnica em Comunidades Remanescentes de Quilombo Brasileiras**. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MAO, X.; BIGHAM, A. W.; MEI, R. *et al.* A genomewide admixture mapping panel for Hispanic/Latino populations. **American journal of human genetics**, v. 80, n. 6, p. 1171-8, 2007.

MARRERO, A. R.; SILVA-JUNIOR, W.A.; BRAVI, C.M.; HUTZ, M.H.; PETZL-ERLER, M.L.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, FRANCISCO M., *et al.* Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang natives of Brazil. **American journal of physical anthropology**, v. 132, n. 2, p. 301-10, 2007.

MARTINEZ-FIERRO, M.L.; BEUTEN, J.; LEACH, R.J.; PARRA, E.J.; CRUZ-LOPEZ, M.; RANGEL-VILLALOBOS, H.; RIEGO-RUIZ, L.R.; ORTIZ-LOPEZ, R.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, H.G.; ROJAS-MARTINEZ, A. Ancestry informative markers and admixture proportions in northeastern Mexico. **Journal of Human Genetics**, v. 54, n. 9: p. 504-9, 2009.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. **Nucleic Acids Research**, n. 16, p. 1215, 1988.

MILLS, R. E.; LUTTIG, C. T.; LARKINS, C. E. *et al.* An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. **Genome research**, v. 16, n. 9, p. 1182-90, 2006.

MUNIZ, Y. C. N. **Marcadores Genéticos de Ancestralidade em Comunidades Fundadas por Açorianos na Ilha de Santa Catarina**. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

PARRA, E. J.; MARCINI, A.; AKEY, *Jet al.* Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *American journal of human genetics*, v. 63, n. 6, p. 1839–51, 1998.

PRICE, A. L.; PATTERSON, N.; YU, F. *et al.* A genomewide admixture map for Latino populations. **American journal of human genetics**, v. 80, n. 6, p. 1024-36, 2007.

PRITCHARD, J. K., PRZEWORSKI, M. Linkage Disequilibrium in Humans: Models and Data. **Am J Hum Genet.**, v. 69, p. 1-14, 2001.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenism. **J Hered** 86: 248-249, 1995a.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution** 49: 1280-1283, 1995b.

REICH, D. E.; GOLDSTEIN, D. B. Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. **Genetic epidemiology**, v. 20, n. 1, p. 4-16, 2001.

REINER, A. P.; ZIV, E.; LIND, D. L. *et al.* Population structure, admixture, and aging-related phenotypes in African American adults:



the Cardiovascular Health Study. **American journal of human genetics**, v. 76, n. 3, p. 463-77, 2005.

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil**. Companhia das Letras, São Paulo, 1995.

RIBEIRO, M.A. C-Reactive Protein: Re-evaluation of a Diagnostic Laboratory Test. **Braz J Infect Dis.**, v. 5, p. 212-225, 1997.

RISCH, N., MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1516-1517, 1996.

ROSENBERG, N. A.; HUANG, L.; JEWETT, E. M. *et al.* Genome-wide association studies in diverse populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 5, p. 356-366, 2010.

ROSENBERG, NOAH A; PRITCHARD, JONATHAN K; WEBER, J. L. *et al.* Genetic structure of human populations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5602, p. 2381-5, 2002.

SACHIDANANDAM, R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C. *et al.* A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 928-33, 2001.

SALZANO, F. M.; FREIRE-MAIA, N. Problems in human biology: a study of Brazilian populations. Detroit, Wayne State University Press, 1970.

SCHIAVETTO, S. N. **A arqueologia Guarani : construção e desconstrução da identidade indígena**. 2003.

SELDIN, M. F.; MORII, T.; COLLINS-SCHRAMM, H. E. *et al.* Putative ancestral origins of chromosomal segments in individual african americans: implications for admixture mapping. **Genome research**, v. 14, n. 6, p. 1076-84, 2004.

SHRIVER, M. D.; PARRA, E. J.; DIOS, S. *et al.* Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping. **Human genetics**, v. 112, n. 4, p. 387–99, 2003.

SHRIVER, M. D. Ethnic variation as a key to the biology of human disease. **Ann Intern Med**, v. 127, n. 5, p. 401-3, 1997.

SILVA, M. C. F., ZUCCHERATO, L. W., SOARES-SOUZA, G. B., VIEIRA, Z. M., CABRERA, L., HERRERA, P., BALQUI, J., ROMERO, C., JAHUIRA, H., GILMAN, R. H., MARTINS, M. L., TARAZONA-SANTOS, E. Development of two multiplex mini-sequencing panels of ancestry informative SNPs for studies in Latin Americans: an application to populations of the State of Minas Gerais (Brazil). **Genetics and molecular research**, v. 9, n. 4, p. 2069-2085, 2010.

SMITH, M. W.; PATTERSON, N.; LAUTENBERGER, J. A; *et al.* A high-density admixture map for disease gene discovery in african americans. **American journal of human genetics**, v. 74, n. 5, p. 1001-13, 2004.

TANG, H., QUERTERMOUS, T., RODRIGUEZ, B., KARDIA, S. L. R., ZHU, X., BROWN, A., PANKOW, J. S., PROVINCE, M., HUNT, S. C., BOERWINKLE, E., SCHORK, N. J., RISCH, N. J. Genetic structure, self-identified race/ethnicity, and confounding in case-control association studies. **American journal of human genetics**, v. 76, n. 2, p. 268-275, 2005.

TARAZONA-SANTOS, E.M.; RAIMONDI, s.; FUSELLI, S. Controlling the effects of population stratification by admixture in pharmacogenomics. In: Suarez-Kurtz G (Ed.). **Pharmacogenomics in admixed populations**. Landes Bioscience, Austin, Estados Unidos, p 1-16, 2007.

TAVARES, L. H. D. Comércio proibido de escravos. São Paulo, Ática, 1988.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. **Nature**, v. 449, p. 851-861, 2007.

TIAN, C.; HINDS, D. A.; SHIGETA, R. *et al.* ARTICLE A Genomewide Single-Nucleotide – Polymorphism Panel with High Ancestry Information for African American Admixture Mapping. **The American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. October, p. 640-649, 2006.

TIAN, C.; HINDS, D. A.; SHIGETA, R. *et al.* A Genomewide Single-Nucleotide–Polymorphism Panel for Mexican American Admixture Mapping. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 6, p. 1014-1023, 2007.

WEBER, P.; CAMMAS, F.; GERARD, C. *et al.* Germ cell expression of the transcriptional co-repressor TIF1 $\beta$  is required for the maintenance of spermatogenesis in the mouse. **Development**, v. 2337, p. 2329-2337, 2002.

WEISS, K., CLARK, A. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2002.

WINKLER, C. A., NELSON, G. W., SMITH, M. W. Admixture mapping comes of age. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 11, p. 65-89, 2010.

ZEMBRZUSKI, V. M.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; HUTZ, M. H. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. **Annals of human genetics**, v. 70, n. Pt 6, p. 822–8, 2006.

## **APÊNDICE A - Questionário aplicado nos pacientes com Artrite Reumatóide**



Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB  
Departamento de Clínica Médica/CCS  
Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Artrite  
Reumatoide

NOME \_\_\_\_\_ PRONTUÁRIO/HU \_\_\_\_\_  
 IDADE: \_\_\_\_ anos SEXO: ☐ F ☐ M ( ) M COR da Pele: \_\_\_\_\_  
 Procedência: \_\_\_\_\_ Natural de: \_\_\_\_\_  
 Estado ☐ S ☐ C ☐ D ☐ V Ocupação: \_\_\_\_\_  
 Civil: \_\_\_\_\_  
 Telefone: ( ) \_\_\_\_\_ Celular: ( ) \_\_\_\_\_  
 e-mail: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

DATA da coleta: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ AR: \_\_\_\_\_

Médico: \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

DADOS Familiares:

NOME do pai: \_\_\_\_\_  
 CIDADE onde nasceu: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
 ASCENDÊNCIA Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

NOME da mãe: \_\_\_\_\_  
 CIDADE onde nasceu: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
 ASCENDÊNCIA Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Tempo de doença diagnosticada: \_\_\_\_\_

Histórico Familiar: AR ☐ S ☐ N Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Outras D. ☐ S ☐ N Parentesco: \_\_\_\_\_  
 Reumat. \_\_\_\_\_

Manifestações Iniciais: ☐ Febre ☐ Rigidez Matinal

<u>Articulações acometidas</u>	<input type="checkbox"/> Derrame Articular	<input type="checkbox"/> Dor Articular
	<input type="checkbox"/> Ombro	<input type="checkbox"/> Cotovelo
	<input type="checkbox"/> IFPM	<input type="checkbox"/> Punho
	<input type="checkbox"/> MTF	<input type="checkbox"/> MCF
	<input type="checkbox"/> Quadril	<input type="checkbox"/> Joelho
	<input type="checkbox"/> IFPP	<input type="checkbox"/> Tornozelo
		<input type="checkbox"/> Outras _____

Manifestações Extra-articulares:

<input type="checkbox"/> Pleurite	<input type="checkbox"/> Pericardite
<input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide	<input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides
<input type="checkbox"/> Acometimento Ocular	<input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar
<input type="checkbox"/> Acometimento Renal	<input type="checkbox"/> Amiloidose
<input type="checkbox"/> Outras _____	

**Evolução:** \_\_\_\_\_ **Internações:** ☐ S ☐ N **Informações** \_\_\_\_\_

---



---

**Observações:** Osteoporose? Diabetes? Depressão? \_\_\_\_\_

---

Sintomatologia Recente: (Nos últimos 10 dias)

<input type="checkbox"/> Febre	<input type="checkbox"/> Rigidez Matinal
<input type="checkbox"/> Derrame Articular	<input type="checkbox"/> Dor Articular

Articulações acometidas

<input type="checkbox"/> Ombro	<input type="checkbox"/> Cotovelo	<input type="checkbox"/> Punho	<input type="checkbox"/> MCF
<input type="checkbox"/> IFPM	<input type="checkbox"/> Quadril	<input type="checkbox"/> Joelho	<input type="checkbox"/> Tornozelo
<input type="checkbox"/> MTF	<input type="checkbox"/> IFPP	<input type="checkbox"/> Outras _____	

Manifestações Extra-articulares:

<input type="checkbox"/> Pleurite	<input type="checkbox"/> Pericardite
<input type="checkbox"/> Vasculite Reumatóide	<input type="checkbox"/> Nódulos Reumatóides
<input type="checkbox"/> Acometimento Ocular	<input type="checkbox"/> Acometimento Pulmonar
<input type="checkbox"/> Acometimento Renal	<input type="checkbox"/> Amiloidose
<input type="checkbox"/> Outras _____	

**Envolvimento Cardiovascular:**

<input type="checkbox"/> HAS	<input type="checkbox"/> Doença Coronariana
<input type="checkbox"/> Angina	<input type="checkbox"/> IAM Prévio

☐ Revascularização do Miocárdio
 ☐ Cateterismo Prévio

Envolvimento Neurológico: ☐ AVC ☐ AIT ☐ Ateroma em Carótidas

Dislipidemia: ☐ Hipercolesterolemia ☐ Hipertrigliceridemia

Hist. Familiar de Doença Cardiovascular: ☐ S ☐ N Parentesco \_\_\_\_\_

Tratamento Atual: CORTICosteróide: ☐ S ☐ N Nome \_\_\_\_\_

	Dose		Frequência	
METOTrexato:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
SULFASSALazina:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
ANTIMALárico:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
CICLOFosfamida:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
INFLIXImab:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
ETANERcept:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
AINE:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
ANALGésicos:	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____
Outros	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Dose _____	Frequência _____

---

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_ anos MENOPAU A: ☐ S ☐ N Idade \_\_\_\_\_

Histerectomia ☐ S ☐ N Idade \_\_\_\_\_

Ovariectomia ☐ S ☐ N Idade \_\_\_\_\_

FASE do Ciclo Reprodutivo ☐ Menacme ☐ Climatério

GESTAções \_\_\_\_\_ PARidade \_\_\_\_\_

Abortos? ☐ Induzido ☐ Espontâneo

Tratamento Hormonal Antes do Diagnóstico: ☐ S ☐ N Qual? ☐ AC ☐ Outro \_\_\_\_\_

Duração: \_\_\_\_\_ Parou há quanto tempo: \_\_\_\_\_

Tratamento Medicamentos ☐ S ☐ N Qual? \_\_\_\_\_  
Antes do Diagnóstico:

História de Uso de DROGAS:      Alcool: ☐ S ☐ N Qual? \_\_\_\_\_  
Quantidade \_\_\_\_\_ Frequência: \_\_\_\_\_  
Cigarro: ☐ S ☐ N Cigarros/dia \_\_\_\_\_  
Se fumava, qual a duração? \_\_\_\_\_  
Quando parou? \_\_\_\_\_  
Algum familiar ou amigo próximo é fumante? ☐ S ☐ N \_\_\_\_\_  
Drogas Ilícitas: ☐ S ☐ N Qual? \_\_\_\_\_  
Por quanto tempo? \_\_\_\_\_



**Health Assessment Questionnaire (HAQ)**

Você é capaz de:	Nível de dificuldade			
	Sem qualquer	Com alguma	Com muita	Incapaz
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões do sapato e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e seus	0	1	2	3
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?	0	1	2	3
4. Deitar-se e levantar-se da cama?	0	1	2	3
5. Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6. Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café ou água?	0	1	2	3
7. Abrir um saco de leite comum?	0	1	2	3
8. Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9. Subir 5 degraus?	0	1	2	3
10. Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11. Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg que está posicionado pouco acima da sua cabeça?	0	1	2	3
14. Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15. Segurar-se em pé no ônibus ou no metrô?	0	1	2	3
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido abertos previamente?	0	1	2	3
17. Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18. Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	2	3
19. Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20. Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	0	1	2	3

**Escore dos Componentes:**

Componente 1	perguntas 1 e 2: _____	Maior escore: _____
Componente 2	perguntas 3 e 4: _____	Maior escore: _____
Componente 3	perguntas 5, 6 e 7: _____	Maior escore: _____
Componente 4	perguntas 8 e 9: _____	Maior escore: _____
Componente 5	perguntas 10, 11 e 12: _____	Maior escore: _____
Componente 6	perguntas 13 e 14: _____	Maior escore: _____
Componente 7	perguntas 15 e 16: _____	Maior escore: _____
Componente 8	perguntas 18, 19 e 20: _____	Maior escore: _____

## **APÊNDICE B – Questionário indivíduos controle**



Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB  
Laboratório de Polimorfismo Genético

## QUESTIONÁRIO INDIVÍDUOS-CONTROLES

**Dados Pessoais:**

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_

**Cidade:** \_\_\_\_\_ **Telefone**

**Residencial:** \_\_\_\_\_

**Telefone Trabalho:** \_\_\_\_\_ **Celular:**

**Idade:** \_\_\_\_\_ **Sexo:** ( ) M ( ) F **Data de nascimento:**

**Estado Civil:** \_\_\_\_\_ **Tipo de sangue:** \_\_\_\_\_

**Profissão:** \_\_\_\_\_ **Aposentado:** ( ) Sim ( ) Não

**Escolaridade:**

( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo

( ) 2º grau incompleto ( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto

( ) superior completo ( ) pós graduação

**Peso:** \_\_\_\_\_ **Altura:** \_\_\_\_\_

**Cidade onde nasceu:** \_\_\_\_\_

**Ascendência:** \_\_\_\_\_

**Materna:** \_\_\_\_\_ **Paterna:** \_\_\_\_\_

**Etnia:** ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente

( ) Asiático descendente ( ) Indígena descendente

**Cor da pele:** ( ) negra ( ) mulata ( ) amarela ( ) branca

**Observe a seguinte:** \_\_\_\_\_

**Dados Familiares:**

Nome do pai: \_\_\_\_\_  
 Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_  
 Descendência do pai: \_\_\_\_\_  
 Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_  
 Profissão: \_\_\_\_\_  
 Nome da mãe: \_\_\_\_\_  
 Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_  
 Descendência da mãe: \_\_\_\_\_  
 Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_  
 Profissão: \_\_\_\_\_  
 Possui Irmãos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_  
 Possui filhos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_  
 Ingera **BEBIDA ALCOÓLICA**? ( ) Sim ( ) Não  
 Frequência: ( ) Todos os dias ( ) Fim de semana  
 ( ) Esporadicamente (Festas)  
 Quantidade ( copos 200 ml ): \_\_\_\_\_  
 Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?  
 ( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro  
 Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?  
 ( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro  
 Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? ( ) Sim ( ) Não  
 Tipo: \_\_\_\_\_  
 Quantidade: ( ) menos de 30 min ( ) 30 min ( ) 1h ( ) mais de 1 h  
 Frequência: ( ) 1x semana ( ) 2-3x semana ( ) 4-6x semana  
 ( ) Todo os dias ( ) Menos de 1x semana  
 Você **FUMA**? ( ) Sim ( ) Não Você já **FUMOU**? ( ) Sim ( ) Não  
 Tipo: ( ) Cigarro ( ) Charuto ( ) Cachimbo ( ) Outro  
 Quantidade e Frequência (n° de cigarros por dia):  
 Tempo que fuma ou fumou: \_\_\_\_\_  
 Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_  
**Histórico Hormonal e Reprodutivo**  
 Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_  
 MENOPAUSA: ( ) Sim ( ) Não Idade: \_\_\_\_\_

HISTERECTOMIA: ( ) Sim ( ) Não

PARIDADE:

Nº de gestações \_\_\_\_\_ Idade da 1ª gestação \_\_\_\_\_

Nº de filhos ( ) multipara N: \_\_\_\_\_

Abortos ( ) P ( ) E N: \_\_\_\_\_

Amamentou: ( ) Sim ( ) Não Tempo total (meses): \_\_\_\_\_

TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? ( ) Sim ( ) Não Já utilizou AC? ( ) Sim ( ) Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: \_\_\_\_\_

Tempo que usa ou usou AC: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

Faz TRH? ( ) Sim ( ) Não Já fez TRH? ( ) Sim ( ) Não

Nome do Hormônio: \_\_\_\_\_

Tempo que faz ou fez TRH: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

( ) Outros hormônios \_\_\_\_\_ Tempo total: \_\_\_\_\_

Observações \_\_\_\_\_

**Histórico Médico**

Caso de **CÂNCER** pessoal? ( ) Sim ( ) Não

T i p o : \_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco: ( ) filha ( ) irmã ( ) mãe ( ) avó

( ) tia materna 1º grau ( ) tia paterna 1º grau

( ) prima materna 1º grau ( ) prima paterna 1º grau

( ) Outros \_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? ( ) Sim ( ) Não

Local: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? ( ) Sim ( ) Não  
 Q u a l \_\_\_\_\_ ?

Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_  
 Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? ( ) Sim ( ) Não  
 Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? ( ) Sim ( ) Não  
 Q u a l \_\_\_\_\_ ?  
 (s) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**HIPERTENSÃO ARTERIAL**: ( ) Sim ( ) Não  
**HIPERCOLESTEROLEMIA**: ( ) Sim ( ) Não  
**OSTEOPOROSE**: ( ) Sim ( ) Não  
**DOENÇA REUMÁTICA**: ( ) Sim ( ) Não  
**DIABETES**: ( ) Sim ( ) Não  
**ASMA**: ( ) Sim ( ) Não  
**HIV**: ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame  
**HEPATITE**: ( ) Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame  
**DENGUE**: ( ) Sim ( ) Não  
**TUBERCULOSE**: ( ) Sim ( ) Não  
**DISTÚRBIO RENAL**: ( ) Sim ( ) Não  
**DISTÚRBIO PULMONAR**: ( ) Sim ( ) Não  
**DISTÚRBIO HEPÁTICO**: ( ) Sim ( ) Não

Casos de **DOENÇA DE ALZHEIMER** na família: ( ) Sim ( ) Não  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Casos de **DOENÇA DE PARKINSON** na família: ( ) Sim ( ) Não  
 Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

O U T R A S  
**DOENÇAS**? \_\_\_\_\_  
 Alérgico a algum medicamento? \_\_\_\_\_

Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_

Teve **DEPRESSÃO**? \_\_\_\_\_

---

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? ( ) Sim ( ) Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

---

---

---



## **APÊNDICE C – Termo de consentimento livre esclarecido, indivíduos-controles**



Universidade Federal de Santa Catarina  
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética/CCB  
Laboratório de Polimorfismos Genéticos

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO INDIVÍDUOS-CONTROLES

**Projetos de Pesquisa:** "Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina", "Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lupus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina" e "Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Psoríase no Estado de Santa Catarina"

**Informações:** Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes. Para isto pedimos sua colaboração e permissão para fazer parte do grupo controle e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de DNA (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

**Procedimentos:** Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas. Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa. O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

**Riscos:** A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

**Custos:** Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

**Benefícios:** Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do

câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Assinaturas:

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas "Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina", "Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide em pacientes de Santa Catarina" e "Estudo Genético e Epidemiológico em Pacientes com Piorriase no Estado de Santa Catarina" e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.

Florianópolis, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ R.G: \_\_\_\_\_

**APENDICE D – Termo de consentimento livre e esclarecido ao  
paciente com artrite**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E  
GENÉTICA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO  
PACIENTE**

**Projeto de Pesquisa:** "GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE:  
POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E  
ARTRITE REUMATÓIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA".

**Informações:**

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos genéticos e da saúde de controles saudáveis e de pacientes que desenvolveram Artrite Reumatoide. Para isso pedimos sua colaboração e permissão para doação de 10 ml de sangue periférico, que contém o DNA (molécula que contém os genes, que carregam as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns de seus genes, propostos no atual projeto (ligados ao metabolismo de medicamentos e de substâncias estranhas ao organismo e, também, relacionados à resposta imunológica), e o aparecimento desta doença. O DNA extraído das amostras coletadas será armazenado no Laboratório, sob responsabilidade da coordenadora do projeto. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que sua participação é voluntária, não influenciando no seu atendimento e tratamento. As informações aqui coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número (48) 3721-9804 e conversar com a Profa. Dra. Iliáda Rainha de Souza ou com

o Prof. Dr. Ivânio Alves Pereira (no ambulatório de Reumatologia, telefone: 3721-9133).

**Procedimentos:**

Caso concorde em participar, você irá responder a um questionário com duração aproximada de 5 minutos, para sabermos se você teve outras doenças, se outras pessoas na sua família tiveram doença autoimune, como artrite reumatoide ou outra doença reumática, etc.

**Riscos:**

A coleta de sangue é um procedimento normal durante o tratamento da sua doença. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer, não representando maiores preocupações.

**Custos:**

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

**Benefícios**

Você não terá nenhum benefício direto logo após participar desta pesquisa, no entanto, os resultados deste estudo poderão permitir, num futuro próximo, um tratamento mais eficaz. Num futuro posterior, poderá permitir novas alternativas para prevenção da doença e identificação de pessoas que possuem risco em desenvolver a doença.

**Assinaturas:**

Pesquisador auxiliar \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu,

\_\_\_\_\_, fui esclarecido(a) sobre a pesquisa "GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: POLIMORFISMOS EM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATOIDE EM PACIENTES DE SANTA CATARINA", e concordo que meus dados sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

## APENDICE E – Metodologia de extração genômica e PCR

### Extração do DNA genômico

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas (Centrifuge 206 BL Excelsa II®) a 3000g (1835rpm) durante 15 min a temperatura ambiente (TA) para a separação dos componentes sanguíneos. Após a centrifugação, foram separados o plasma, o concentrado de hemácias e a camada de leucócitos. Esses componentes sanguíneos foram aliquotados, identificados e estocados a -20°C. Os leucócitos foram utilizados para a extração do DNA genômico. O plasma e o concentrado de hemácias não foram utilizados nesse estudo.

### Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; Sacarose 0,32M, Merck®; MgCl<sub>2</sub> 0,0025M; Triton X 100 – 1%, Nuclear®);
- 2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M, Amresco®; KCl 0,05M, Vetec®); MgCl<sub>2</sub> 0,0025M, Nuclear®); Nonidet – 1%, Amresco®; TWEEN 20 – 1%, Amresco®);
- 3) SDS 10%(Amresco®);
- 4) Solução de Perclorato de Sódio 5,0M (Vetec®);
- 5) Solução Saturada de NaCl 6,0M (Nuclear®);
- 6) TE (Tris-HCl 1M, Amresco®; EDTA 0,5M, Vetec®);
- 7) Álcool Isopropílico Absoluto, TA- Temperatura Ambiente (Merck®);
- 8) Etanol 70%, TA (Merck®).

### Procedimento

A extração de DNA foi realizada através de um método de *Salting Out* modificado, baseado em Miller *et al.* (1988). Para cada amostra, foram colocados 100µL da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5mL (tipo eppendorf), utilizando-se uma micropipeta e ponteiros estéreis. Em seguida, adicionou-se 1,0mL Solução de Lise I em cada um desses microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (Centrifuge 5415D, Eppendorf®) a 13400g (12000rpm) durante 4 min a TA. O sobrenadante foi descartado e, este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando a presença dos glóbulos brancos.

Posteriormente, foi acrescentado ao precipitado de leucócitos 300µL de Solução de Lise II, 10µL de SDS 10% e 75µL de Perclorato



de Sódio 5M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos, do tipo vórtex, e a cada tubo foi acrescentado 130µL de NaCl 6M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min a TA. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para esses, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300µL de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400g por 15 min.

O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300µL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, a temperatura ambiente, overnight. Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100 µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 min e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

## **Reação em Cadeia da Polimerase**

### ***Reagentes e Soluções***

1) Água Ultrapura;

2) dNTPs solução estoque: quatro soluções separadas de 100mM de cada base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 8,3 (Invitrogen®);

3) dNTP solução de trabalho (20mM): obtida diluindo-se com água a solução estoque (100mM) de cada dNTP para uma solução única de concentração 20mM (160 µL de água de MiliQ autoclavada mais 10 µL da solução estoque de cada dNTP);

4) MgCl<sub>2</sub> 1,5mM (50mM, Invitrogen®);

5) Tampão de PCR 10X (0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; Invitrogen®);

6) Iniciadores (Primers) específicos – solução estoque (100 µM): os primers liofilizados (IDT®) Forward e Reverse específicos para cada AIM foram diluídos em água autoclavada, e estocados separadamente;

7) Iniciadores (Primers) – solução trabalho (2,5 µM): 10 µL do primer Forward, 10 µL do primer Reverse e 180 µL de água auto-clavada;

8) Taq DNA Polymerase Platinum (0,5U/µL; Invitrogen®);

### ***Procedimento***

Os ensaios da PCR foram realizados em um volume total de 25 µL. Todos os reagentes (Água, Tampão, dNTP – solução trabalho,

primers – solução trabalho,  $MgCl_2$  e a TaqPlatinum DNA polimerase), com exceção do DNA, foram misturados para cada *locus* em um único tubo de 0,6  $\mu L$  (mistura de reação) para garantir a homogeneidade das reações. O cálculo para uma reação foi: 16,15  $\mu L$  de água; 2,5  $\mu L$  de Tampão de PCR; 0,25  $\mu L$  de dNTP (solução trabalho); 1,00  $\mu L$  de  $MgCl_2$ ; 2,00  $\mu L$  de Primers (solução trabalho) e 0,1  $\mu L$  de TaqPlatinum Polimerase. Após feito o mix de reação, 22  $\mu L$  da solução de reação são pipetados e distribuídos em todos de 0,2  $\mu L$ .

Em cada microtubo de 0,2  $\mu L$  foram pipetados 3  $\mu L$  do DNA genômico, previamente extraído. Para cada análise foi usado como controle negativo contendo água no lugar do DNA genômico. Em cada microtubo, sob a amostra, foram pipetados 22  $\mu L$  da mistura de reação.

Os termocicladores utilizados foram o Mastercycler, Eppendorf® e MyCycler, Bio-Rad®. A este passo seguiu-se o programa correspondente a cada *locus* (Tabela 9). Após o término da reação de PCR o produto da PCR foi guardado em geladeira (4°C) até sua utilização.

### Condições de PCR

Após um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C, as amostras foram amplificadas por 30 ciclos nas temperaturas de desnaturação/pareamento/extensão especificadas (ToC PCR) para cada *loci*, seguidos por um passo final de extensão por 5 min a 72°C. A menos que indicado em PCR - NOTAS, os passos de desnaturação/pareamento/extensão foram respectivamente: 45 seg; 1min e 1 min.

**Tabela 9:** Condições de PCR dos dois AIMs analisados

Locus	Tipo	PCR Notas	Referência
APO	Inserção <i>Alu</i>	1' des./2' par./2' ext.	LUIZON <i>et al.</i> , 2007
PV92	Inserção <i>Alu</i>	1' des./2' par./2' ext.	

## 4.4.2 Análise dos produtos amplificados

### Reagentes e Soluções

1) UltraPure Agarose (Invitrogen®)

- 2) *Tampão TBE 1X (100mL do Tampão TBE 10X; 900mL H<sub>2</sub>O);*
- 3) *Água Ultrapura;*
- 4) *Peso Molecular de 100pb (BioLabs®)*
- 5) *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium Inc.)*
- 6) *Tampão de Aplicação de Amostras (900 µL de Bromofenol, Merck®; 900 µL Xilenocianol, Sigma-Aldrich®; 900 µL TBE; 4,5mL Ficoll 30% diluído em H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich®; 1,8mL EDTA 0,5M pH 8,0, Vetec®; 3,6g Sacarose, Merck®)*

### ***Procedimento***

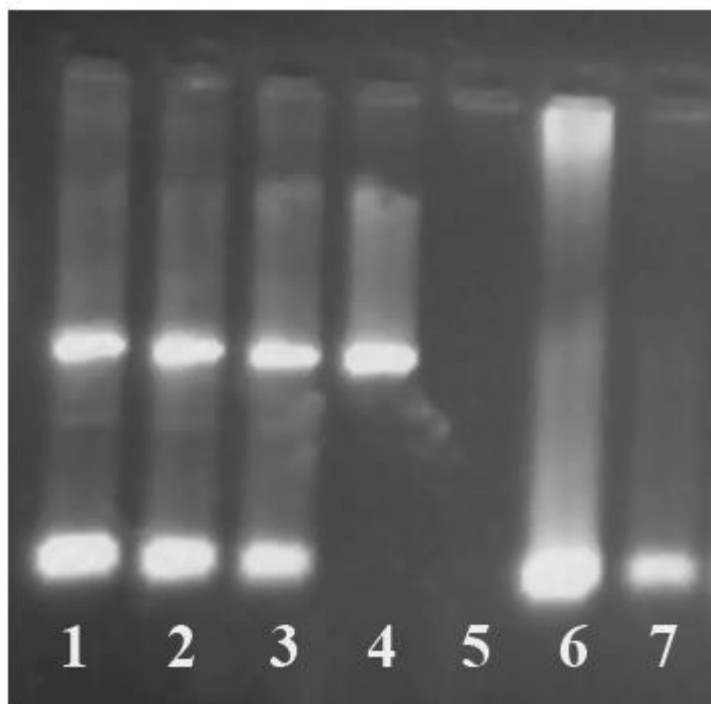
Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de Agarose a 1,5%. Estes géis foram feitos adicionando: 40,0 mL de TBE 0,5%; 0,6 g de Agarose. Essa solução foi colocada em suporte específico para a solidificação do gel e, após este processo, a placa contendo o gel foi encaixada na cuba de eletroforese modelo BIOAHS-12G (Bioamerica Inc.).

As amostras foram preparadas da seguinte forma: 6,0µL de produto de PCR; 1µL de mix de aplicação contendo 0,3 µL de GelRed; 0,3 µL de Tampão de Aplicação de Amostras e 4,0 µL de Água Ultrapura); e, posteriormente, aplicadas no gel. No primeiro poço foi colocado o padrão de peso molecular de 100pb para, posteriormente, ser comparado com as bandas amplificadas.

A corrida foi realizada, durante 50min, e a fonte de eletroforese (CBS, Scientific Company, Modelo EPS 4000) foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 85 e, a Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.

### ***Leitura dos resultados no gel de agarose***

O modo de visualização dos fragmentos de DNA para a detecção e anotação dos AIMs do tipo Inserção *Alu* (APO, PV92) está representado na figura 3. Nessa figura, é possível observar a presença de uma inserção *Alu* homozigota (raia 4), inserção/deleção (raias 1, 2 e 3), deleção homozigota (raias 6 e 7). Na raia 5 não aparece amplificação.



**Figura 3:** Gel de agarose corado com GelRed para visualização de fragmentos de Inserção Alu. O gel digitalizado ilustra a presença de uma inserção Alu homozigota (raia 4), inserção/deleção (raias 1, 2 e 3), deleção homozigota (raias 6 e 7). Imagem retirada de DEBORTOLI, 2013.

# **APÊNDICE F -Frequências dos AIMs (AT3, Sb19.3, APO, PV92) em dois estudos brasileiros do tipo caso-controle**

<b>Zembrzski <i>et al.</i>, 2006*</b>	<b>Casos (DAC)**</b>	<b>Controles</b>
AT3	0,306	0,235
Sb19.3	0,854	0,819
APO	0,942	0,951

\*O marcador PV92 não foi estudado em Zembrzski *et al.*, 2006.

\*\*DAC = Doença Arterial Coronariana.

<b>Brum <i>et al.</i>, 2013</b>	<b>Casos (NO)*</b>	<b>Casos (EM)**</b>	<b>Controles</b>
AT3	0,483	0,310	0,421
Sb19.3	0,698	0,794	0,804
APO	0,888	0,883	0,874
PV92	0,310	0,258	0,336

\*NO= Neuromielite Óptica

\*\*EM = Esclerose Múltipla

## APÊNDICE G – Tabela do Qui-Quadrado

DISTRIBUIÇÃO DO  $\chi^2$ 

GL	PROBABILIDADE													
	0,99	0,98	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,0157	0,01628	0,00393	0,0158	0,0642	0,148	0,455	1,074	1,642	2,706	3,841	5,412	6,635	10,827
2	0,0201	0,0404	0,103	0,211	0,446	0,713	1,386	2,408	3,219	4,605	5,991	7,824	9,210	13,815
3	0,115	0,185	0,352	0,584	1,005	1,424	2,366	3,665	4,642	6,251	7,815	9,837	11,345	16,266
4	0,297	0,429	0,711	1,064	1,649	2,195	3,357	4,878	5,989	7,779	9,488	11,669	13,277	18,467
5	0,554	0,752	1,145	1,610	2,343	3,000	4,351	6,064	7,289	9,236	11,070	13,388	15,086	20,515
6	0,872	1,134	1,635	2,204	3,070	3,828	5,348	7,231	8,558	10,645	12,592	15,033	16,812	22,457
7	1,239	1,564	2,167	2,833	3,822	4,671	6,346	8,383	9,803	12,017	14,067	16,622	18,475	24,322
8	1,646	2,032	2,733	3,490	4,594	5,527	7,344	9,524	11,030	13,362	15,507	18,168	20,090	26,135
9	2,088	2,532	3,325	4,168	5,380	6,393	8,343	10,656	12,242	14,684	16,919	19,679	21,666	27,877
10	2,558	3,059	3,940	4,865	6,179	7,267	9,342	11,871	13,442	15,987	18,307	21,161	23,209	29,288
11	3,053	3,609	4,575	5,578	6,989	8,148	10,341	12,899	14,631	17,275	19,673	22,618	24,725	31,264
12	3,571	4,178	5,226	6,304	7,807	9,034	11,340	14,011	15,812	18,549	21,206	24,054	26,217	32,909
13	4,107	4,765	5,892	7,042	8,634	9,926	12,340	15,119	16,985	19,812	22,362	25,472	27,688	34,528
14	4,660	5,368	6,571	7,790	9,467	10,821	13,339	16,222	18,151	21,064	23,683	26,873	29,141	36,123
15	5,229	5,985	7,261	8,547	10,307	11,721	14,339	17,322	19,311	22,307	24,996	28,259	30,578	37,697